

# BEST AVAILABLE COPY

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Oktober 2004 (21.10.2004)

PCT

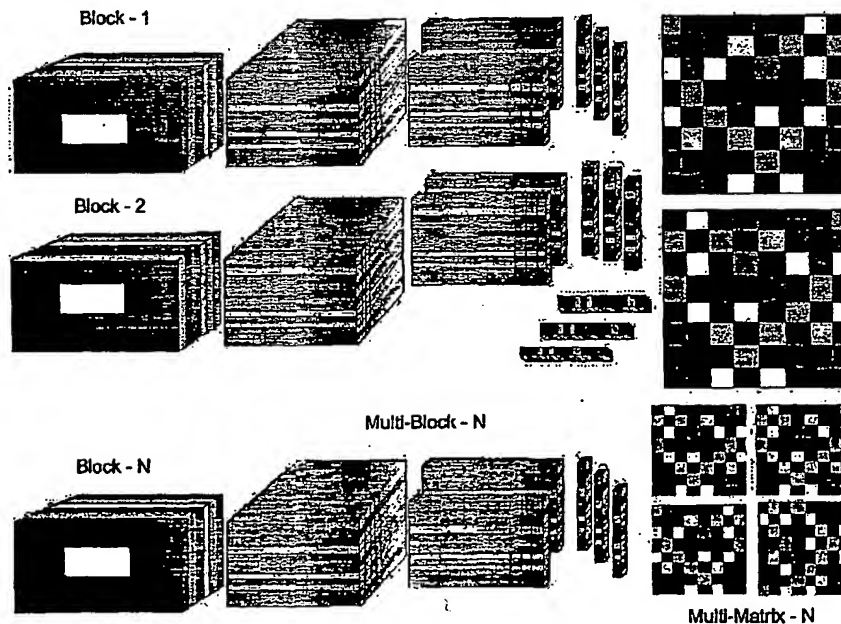
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/089532 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: B01J 19/00, B01L 3/00 (74) Anwälte: KÖNIG, Reimar usw.; Lohengrinstrasse 11, 40549 Düsseldorf (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/003720 (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 2004 (07.04.2004) (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 103 16 689.0 10. April 2003 (10.04.2003) DE
- (71) Anmelder und  
(72) Erfinder: PLACHOV, Dimitrij [DE/DE]; Tresckowstrasse 10, 48163 Münster (DE). GAVRUSHKIN, Alexander [RU/RU]; 142290 Pushino, Moskau AB24-91 (RU).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL CHIP

(54) Bezeichnung: DREIDIMENSIONALER CHIP



(57) Abstract: Disclosed is a chip for analyzing biological material, comprising a support unit made of porous material on which the reference molecules that are used for detecting the molecules of the sample are immobilized.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/089532 A1



RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

- 1 -

"Dreidimensionaler Chip"

Die Erfindung betrifft einen Chip zur Untersuchung biologischer Proben sowie Verfahren zur Herstellung dieser Chips und nimmt die Priorität der deutschen Patentanmeldung 103 16 689.0 in Anspruch, auf die inhaltlich Bezug genommen wird.

5

Biochips finden in jüngster Zeit eine umfangreiche Anwendung beispielsweise bei der Genanalyse, der Mutationsdetektion oder der Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen sowie - allgemein - bei der Diagnose von Erkrankungen oder der Abschätzung der entsprechenden genetischen Dis-

10

position.

Es sind sowohl Genchips als auch Proteinchips (Mikroarrays) bekannt.

15

Die bekannten Chips bestehen aus einem Träger und den auf dem Träger immobilisierten "Target"-Molekülen (nachfolgend auch Referenzmoleküle). Die Referenzmoleküle werden in Abhängigkeit von dem Untersuchungszweck ausgewählt. Das Prinzip des Biochips besteht darin, die Interaktionen zwischen dem bekannten Referenzmolekül und einem noch unbekannten

- 2 -

Probenmolekül - beispielsweise aus einem Patienten oder einem anderen biologischen Material - nachzuweisen und aus diesem Nachweis Rückschlüsse für den Untersuchungszweck zu ziehen.

- 5 Zum Nachweis von Nukleinsäuren müssen die Probenmoleküle zunächst mit den referenzmolekülen hybridisieren. Bei Proteinchips werden Protein-Proteininteraktionen untersucht, beispielsweise die Interaktionen zwischen einem immobilisierten Antigen als Referenzmolekül und einem Antikörper aus der Patientenprobe. Die erfolgten Interaktionen werden häufig durch  
10 Fluoreszenz- oder Isotopenmarkierungen sichtbar gemacht. Die Auswertung der Chips setzt voraus, daß die Position der Referenzmoleküle auf dem Chip bekannt ist.

- Es ist eine Vielzahl von Methoden der Chip-Herstellung bekannt. Diese  
15 basieren häufig entweder auf der direkten Synthese der Referenzmoleküle auf dem Träger oder aber der Vorabsynthese der Referenzmoleküle und ihrem anschließenden Immobilisieren auf den Träger. Die Notwendigkeit, die Position der Referenzmoleküle auf dem Chip zu determinieren, macht die bekannten Verfahren aufwendig und kostenintensiv.

- 20 Biochips haben im Vergleich zu anderen Nachweismethoden den besonderen Vorteil, daß sie die Bearbeitung einer komplexen Fragestellung erlauben. Die Festlegung der Proben auf dem Träger ermöglicht darüber hinaus eine weitgehend automatisierte Auswertung der Ergebnisse, die von  
25 den Möglichkeiten der Informationstechnologie unterstützt wird. Gleichwohl haben die bekannten Biochips noch nicht das gewünschte Maß an Sensitivität und Spezifität erreicht.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Biochip bereitzustellen, der insbesondere hinsichtlich seiner Sensitivität eine Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik darstellt. Des weiteren werden Verfahren  
30

- 3 -

vorgeschlagen, die eine möglichst einfache, schnelle und kostengünstige Herstellung dieser Chips ermöglichen.

5 Unter Sensitivität wird im vorliegenden Zusammenhang die kleinste Konzentration an Probemolekülen verstanden, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Chips noch detektiert werden kann.

10 Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Vorrichtung gemäß dem Hauptanspruch. Die Herstellungsverfahren sind jeweils Gegenstand unabhängiger Verfahrensansprüche.

15 Der vorliegenden Erfindung liegt der Gedanke zugrunde, ein poröses Material als Träger des Biochips zu verwenden und die Referenzmoleküle an diesem porösen Material zu immobilisieren. Die Herstellungsverfahren basieren übereinstimmend darauf, diese Polymere derart anzuordnen, daß sie im einen dreidimensionalen Chip darstellen.

20 Der erfindungsgemäße Chip hat aufgrund des porösen Materials den Vorteil, daß für die Immobilisierung der Referenzmoleküle eine vergrößerte Oberfläche zur Verfügung steht. Die Dichte der Referenzmoleküle pro Trägereinheit kann somit erhöht werden.

25 Des weiteren kann die Verwendung von porösem Material es ermöglichen, auf eine weitere feste Trägersubstanz im Sinne einer Stützschrift zu verzichten. Dies hat nicht nur produktionstechnische und kostenminimierende Vorteile, sondern ermöglicht darüber hinaus den allseitigen Zugang der Probemoleküle aus der Untersuchungsprobe zu den Referenzmolekülen. Im Gegensatz dazu ist der Zugang zu den Probenmolekülen bei bekannten Chips immer nur einseitig möglich. Durch den erleichterten Zugang wird eine  
30 Verbesserung der Sensitivität des Chips erreicht.

- 4 -

Als Trägermaterial können ein oder mehrere Polymere aus folgender Gruppe ausgewählt werden: Polyethylen, Polyvinylchlorid, Polypropylen, Polyethylentereftalat (PET), Polyamid, Polyimid, Polystyrol, Polyvinylidenchlorid (PVDC), Polycarbonat, Cellophan, Acetat oder  
5 Polysulfonat.

Eine Übersicht über die vorteilhaften Eigenschaften dieser Polymere gibt die Tabelle 1.

45 738 K

Tabelle 1

	Folientyp	Dicke (Tiefe) in $\mu\text{m}$	Relative Elongation (Dehnung) in %	Maximal Operation Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Feuchtigkeits- absorption in 24h	Permeabilität für Gas für $\text{O}_2$ $\text{M}/\text{cm}^2 \text{ Pa}$ $10^{-7}$	Permeabilität für Dampf (Schichtdicke 25 $\mu\text{m}$ ) $\text{g}/\text{cm}^2 10^{-4}$
1	Polyethylen	10-300	100-1000	70-120	0.01	300-1150	0.5-20
2	Polyvinylchlorid						
	fest	50-250	5-100	70	0.1-0.5	120-180	3.0-40
	weich	-	200-500	70-90	0.5-1.0	200-300	1.5-4.0
3	Polypropylen	2-400	40-800	130	0.005	170-270	0.8-1.4
4	Polyethylenterephthalat	1-350	60-140	130	0.4-0.5	10-15	2.5-3.0
5	Polyamid	12-200	60-450	120-220	1-9	5-60	4.0-8.0
6	Polyimid	7.5-125	30-130	200-250	2.9	-	-
7	Polysterol	4-500	3-8	70	0.04-0.06	236-665	8.0-17.0
8	Polyvinylidenchlorid	40-150	40-100	140	0.01	1.4-1.9	0.1-0.5
9	Polycarbonat	2-800	85-105	135	0.35	500-700	9.0-10.8
10	Cellophan	-	15-25	150	45-115	40-80	0.6-3.0
11	Acetat	17-250	15-50	95	2.5-4.5	200	11-33
12	Polysulfonat	25-250	60-130	150	0.13-0.20	-	-

Frostbeständigkeit der Polymere:  $-15^{\circ}\text{C}$  bis  $-60^{\circ}\text{C}$   
elektrische Leitfähigkeit bei 50 Hz; 60 bis 600 kV/mm  
partieller Widerstand:  $10^{-9}$  bis  $10^{-18}$  Ohm/cm

Der erfindungsgemäße Chip kann lediglich aus einer Schicht des Trägermaterials bestehen. Die notwendige Stabilität der Schicht kann durch die Wahl einer dafür geeigneten Schichtdicke erreicht werden. Vorteilhafterweise werden aber verschiedenen Schichten kombiniert. Die Schichten  
5 können aus demselben oder aber aus verschiedenen Polymeren bestehen.

Vorteilhafterweise werden die Referenzmoleküle noch vor dem Zusammenbringen der Schichten auf den Polymeren immobilisiert. Die Immobilisierung der Referenzmoleküle auf dem Träger erfolgt mittels der dem Fachmann  
10 bekannten Methoden. Die Schichten mit jeweils einer Qualität von Referenzmolekülen werden nachfolgend als "Trägereinheiten" bezeichnet.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform besteht der Chip aus einer Vielzahl von Trägereinheiten, die - schachbrettartig - in X - und Y-  
15 Richtung sowie übereinander in Z-Richtung nebeneinander liegen.

Durch die Erhöhung der Anzahl der verwendeten Trägereinheiten läßt sich die Anzahl der unterschiedlichen für die Untersuchung bereitgestellten Referenzmoleküle variieren. Selbstverständlich können einzelne  
20 Trägereinheiten auch mehrfach - z.B. zu Kontrollzwecken - vorkommen.

In einer bevorzugten Ausführungsform können die einzelnen Schichten der Trägereinheiten 0,01 bis 1 Mikrometer betragen. Die Fläche der Trägereinheiten kann bis zu einigen Quadratmetern ausgedehnt sein.  
25

Bei einigen als poröses Trägermaterial verwendeten Polymeren, oder bei sehr geringen Schichtdicken, kann es vorteilhaft sein, die Trägereinheiten zumindest teilweise von Stützmitteln zu umgeben. Auch kann weitere Stützmittel auf der Oberseite oder Unterseite des Trägers vorteilhaft sein.  
30 Diese können ebenso aus durchlässigem oder porösem Material bestehen. Sie sind in der Regel nicht mit Referenzmolekülen bestückt. Darüber hinaus



können die Schichten über Haltemittel, wie beispielsweise Klammern, miteinander verbunden sein.

Die erfindungsgemäßen Träger lassen sich leicht und kostengünstig herstellen.

In einer ersten Alternative beginnt der Herstellungsprozeß damit, einzelne Polymerschichten mit Referenzmolekülen zu beschicken. Die Anzahl der Schichten variiert in Abhängigkeit von dem Untersuchungszweck. In einem nächsten Schritt werden die Schichten (Trägereinheiten) zu einem ersten Block aufeinandergelegt und beispielsweise mit einem Mikrotom rechtwinklig zu der Schichtebene geschnitten. Daraus ergeben sich zunächst flächenartige Schnitte mit „Bändern“ aus Trägereinheiten, die jeweils unterschiedliche Referenzmoleküle enthalten.

Schnitte von unterschiedlichen Blöcken können erneut zu einem zweiten Block aufeinandergelegt werden ("Multilayerblocks"). Auch dieser Block wird in dünne schichtförmige Einheiten rechtwinklig zu der Ebene der Schichten geschnitten.

Im Ergebnis entsteht bei dieser Kombination verschiedener Trägereinheiten mit anschließendem Schnitt eine "Multimatrix", die jede Trägereinheit, die ursprünglich in den jeweiligen Blöcken eingesetzt wurde, enthält. Dieses Herstellungsprinzip ist in der Fig. 1 dargestellt.

Bei Kenntnis der eingesetzten Schichten und Kenntnis der Schnittführung sowie erneutem Zusammensetzen der Schnitte läßt sich die Position einer jeden Trägereinheit zweifelsfrei vorherbestimmen oder auch nachträglich nachvollziehen.

Der erfindungsgemäße Träger läßt sich alternativ auch über ein zweites Verfahren herstellen. Dieses wird in Fig. 2 skizziert:

Dieses Verfahren besteht im Kern darin, die Trägereinheiten zunächst auf einem Stützmittel anzuordnen und am gegenüberliegenden Ende der Trägereinheiten mit einer verschieblichen Maske zu bedecken. Diese Maske weist Öffnungen auf, durch die die Trägermaterialien mit Reagenzien - beispielsweise auch mit den Referenzmolekülen - beschickt werden können. Die Öffnungen können beispielsweise zylindrisch oder konisch ausgestaltet sein. Die Maske selber kann über die bekannten Verfahren der Lithographie erzeugt werden.

10

Nach der in der Fig. 2 dargestellten Übersicht kann eine Vorrichtung eingesetzt werden, die eine Maske aus einem festen Material von 400 bis 500  $\mu\text{m}$  Dicke umfaßt. Sie weist konische Öffnungen auf, deren oberer Durchmesser beispielsweise 100  $\mu\text{m}$  und der untere 5  $\mu\text{m}$  betragen kann. Diese Maske ist in X- und Y-Richtung relativ zu den Stützmitteln 4, 2 verschieblich. Es sind auch anderen Abmessungen möglich.

15

Die Stützmittel bestehen in dieser Ausführungsform aus 50 bis 100  $\mu\text{m}$  starken Plastikeinheiten mit Durchlässen von 5 bis 10  $\mu\text{m}$ . Das Trägermaterial selber ist in Aufnahmemitteln 3 angeordnet, die in der dargestellten Ausführungsform 50  $\mu\text{m}$  dick sein können. Die in diesen Stützmitteln vorgesehenen Aufnahmen für das Trägermaterial haben ebenso einen Durchmesser von 5 bis 10  $\mu\text{m}$ . Diese Ausnehmungen können vollständig aus dem porösen Trägermaterial bestehen oder aber mit ihm angefüllt sein.

25

Eine schematische Darstellung der mit verschiedenartigen Trägermaterialien gefüllten Ausnehmungen (kugelförmig, stäbchenförmig oder gelartig) ist in den Fig. 4 und 5 erkennbar.

30

Zur Beschickung des Chips wird die Maske in X- und Y-Richtung relativ zu den Stützmitteln bewegt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis alle gewünschten Trägereinheiten das Reagenz enthält. Dabei entsteht

zunächst ein Chip mit verschiedenen Trägereinheiten, die sich in X- und Y-Richtung ausdehnen. Dieser Chip ist demnach zweidimensional. Zur Fertigstellung des Chips kann die Maske sowie das ihr gegenüberliegende Stützmittel, auf dem die Trägereinheit angeordnet sind, entfernt werden.

5    Somit wird das Trägermaterial erneut von beiden Seiten dem Probenmaterial zugänglich.

Die in den Ausnehmungen befindlichen Träger können mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens beispielsweise sukzessiv mit Nukleinsäuren

10    bestückt werden (Fig. 6). Dazu werden Oligonukleotide in definierter Reihenfolge über den Träger gegeben. Dieses „Wachstum“ der Referenzmoleküle auf dem Träger ist ebenso in der Fig. 7 dargestellt.

In einer weiteren Ausführungsform können die derart hergestellten Chips in

15    Z-Richtung aufeinandergelegt werden, so daß die Trägereinheiten fluchten. Damit entsteht im Ergebnis ein dreidimensionaler Chip (Fig. 2).

Die Auswertung der erfindungsgemäßen Träger setzt voraus, daß die mit den Referenzmolekülen interagierenden Probenmoleküle innerhalb der Trägereinheit detektierbar sind.

20

Die Untersuchung dreidimensionaler Anordnungen ist beispielsweise durch die konfokale Laserscanmikroskopie (LCSM) möglich. Diese erlaubt eine Auswertung auch unterhalb der Chipoberfläche.

25

Die Verwendung der konfokalen Laserscanmikroskopie zur Auswertung des erfindungsgemäßen Chips wird in Fig. 3 schematisch dargestellt:

Die dargestellten Schritte 1 bis 4 zeigt die Aufnahmen der Signale entlang

30    der Z-Achse. Der Schritt 5 gibt die Bewegung entlang der Y-Achse wieder.

- 10 -

- Im Schritt 1 tritt der Laserstrahl durch die licht-brechende Platte zu dem Objektiv des Mikroskops und wird damit auf Punkte mit einem Durchmesser von 5 bis 10  $\mu\text{m}$  fokussiert. Damit wird die Lumineszenz in dem Spot angeregt. Als Ergebnis dieser Anregung wird ein zweiter Lichtstrahl durch die
- 5 Platte zu dem Detektor geschickt. Das Signal und deren räumliche Koordinaten werden dokumentiert. Danach bewegt sich der Laser und fokussiert auf einen weiteren Spot.

Patentansprüche

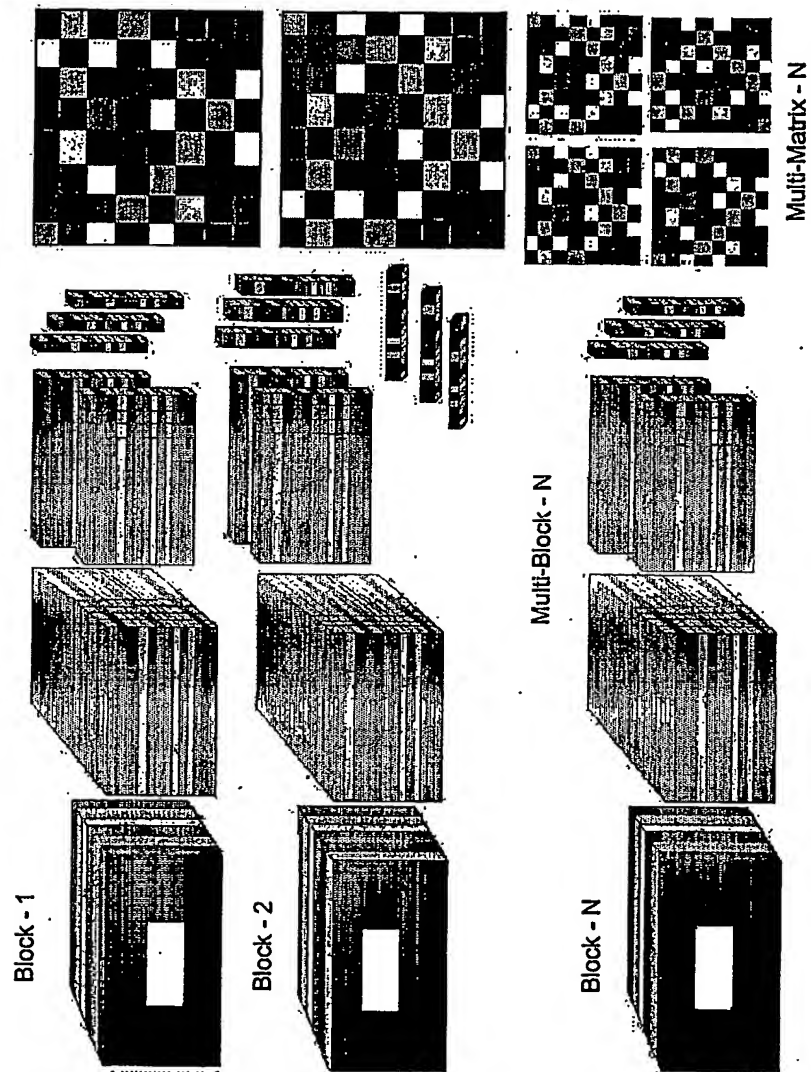
1. Chip zur Untersuchung biologischen Materials mit einer Trägereinheit aus porösem Material, an dem die der Detektion der Probenmoleküle dienenden Referenzmoleküle immobilisiert sind.  
5
2. Chip nach Anspruch 1 **gekennzeichnet durch** mindestens zwei Trägereinheiten mit unterschiedlichen Referenzmolekülen, die in der X- oder Y-Achse aneinander liegen.  
10
3. Chip nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens einige der Trägereinheiten in der Z-Achse aneinander liegen.
4. Chip nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Trägereinheiten mindestens teilweise von Stützmitteln oder Haltermitteln umgeben sind.  
15
5. Chip nach einem der vorherigen Ansprüche **dadurch gekennzeichnet, daß die** Trägereinheiten eins der folgenden Polymere umfassen: Polyethylen, Polyvinylchlorid, Polypropylen, Polyethylentereftalat (PET), Polyamid, Polyimid, Polystyrol, Polyvinylidenchlorid (PVDC), Polycarbonat, Cellophan, Acetat oder Polysulfonat.  
20
6. Verfahren zur Herstellung eines Chips nach einem der vorherigen Ansprüche mit folgenden Schritten:  
25
  - a. Immobilisieren einer Gruppe von Probenmolekülen auf einer ersten Trägereinheit und Immobilisieren einer zweiten Gruppe von Probenmolekülen auf einer zweiten Trägereinheit,
  - 30 b. Anordnen der Trägereinheiten zu einem Block mit gemeinsamer Z-Achse,
  - c. Anfertigen von Schnitten rechtwinklig zur Ebene des Blockes,

- 12 -

- d. Wiederholen der Schritte a. bis b. zur Bereitstellung eines zweiten Blockes aus Trägereinheiten sowie Schnitten davon,
  - e. Kombinieren der Schnitte aus c. und d. zu einem Block mit gemeinsamer Z-Achse,
  - 5 f. Wiederholen des Schrittes von b.
7. Verfahren zur Herstellung eines Chips nach einem der Ansprüche 1 bis 5 mit folgenden Schritten:
- 10 a. Anordnen von Trägereinheiten aus porösem Material auf einem Stützmittel,
  - b. Bedecken der Trägereinheiten an ihrem dem Stützmittel gegenüberliegenden Ende mit einer Maske mit mindestens einer Öffnung, die einen Durchlaß zu einer unterhalb der Maske liegenden
  - 15 Trägereinheit ermöglichen kann,
  - c. Verfahren der Maske, so daß die Öffnung über eine Trägereinheit liegt,
  - d. Beschicken der Trägereinheit mit Referenzmolekülen,
  - e. Untersuchung von biologischen Molekülen eines dreidimensionalen Trägers gekennzeichnet durch die Verwendung der konfokalen
  - 20 Laserscanmikroskopie.
8. Verwendung der konfokalen Laserscanmikroskopie zur Auswertung eines dreidimensionalen Chip.

25

Fig. 1



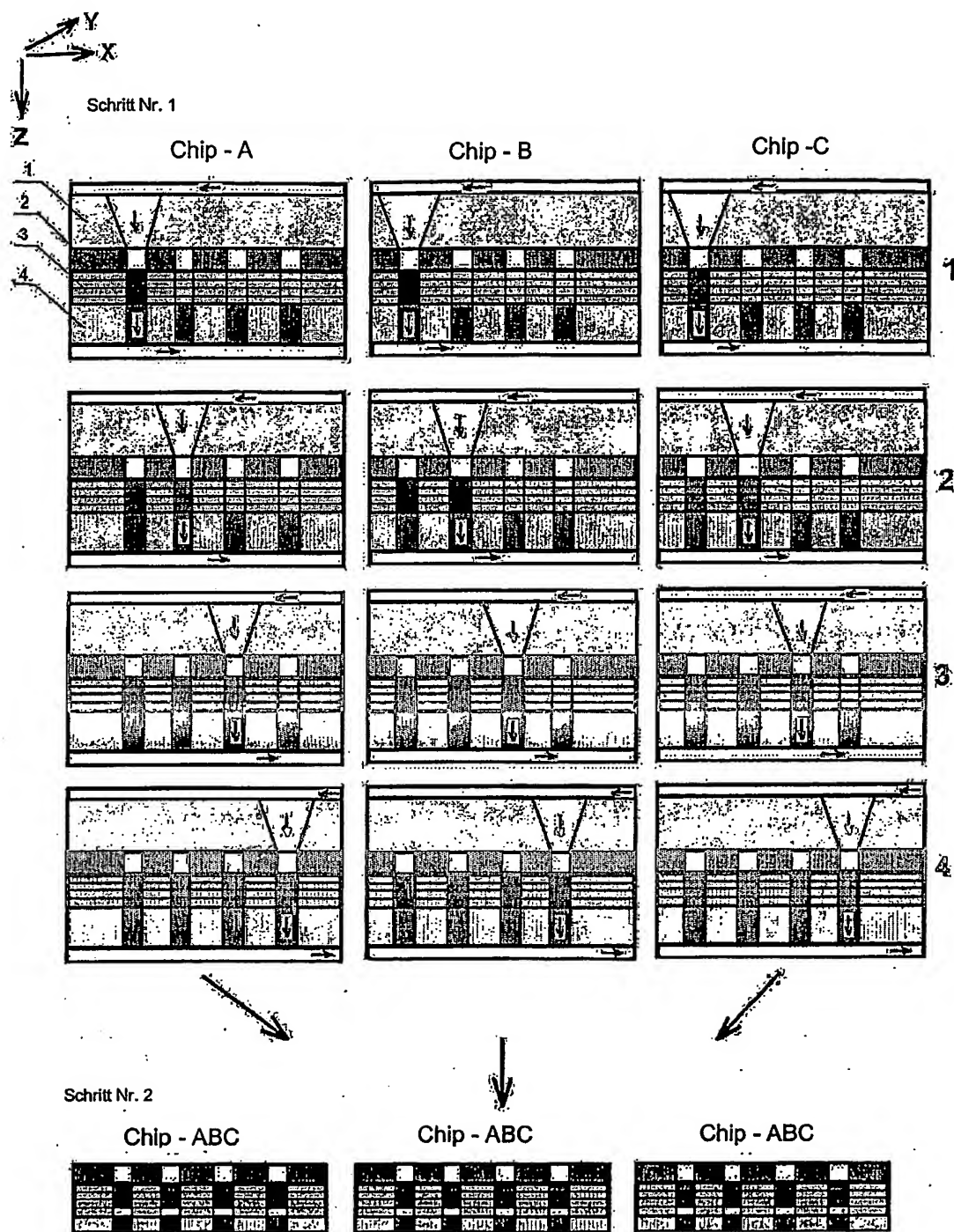


Fig. 2



3/7

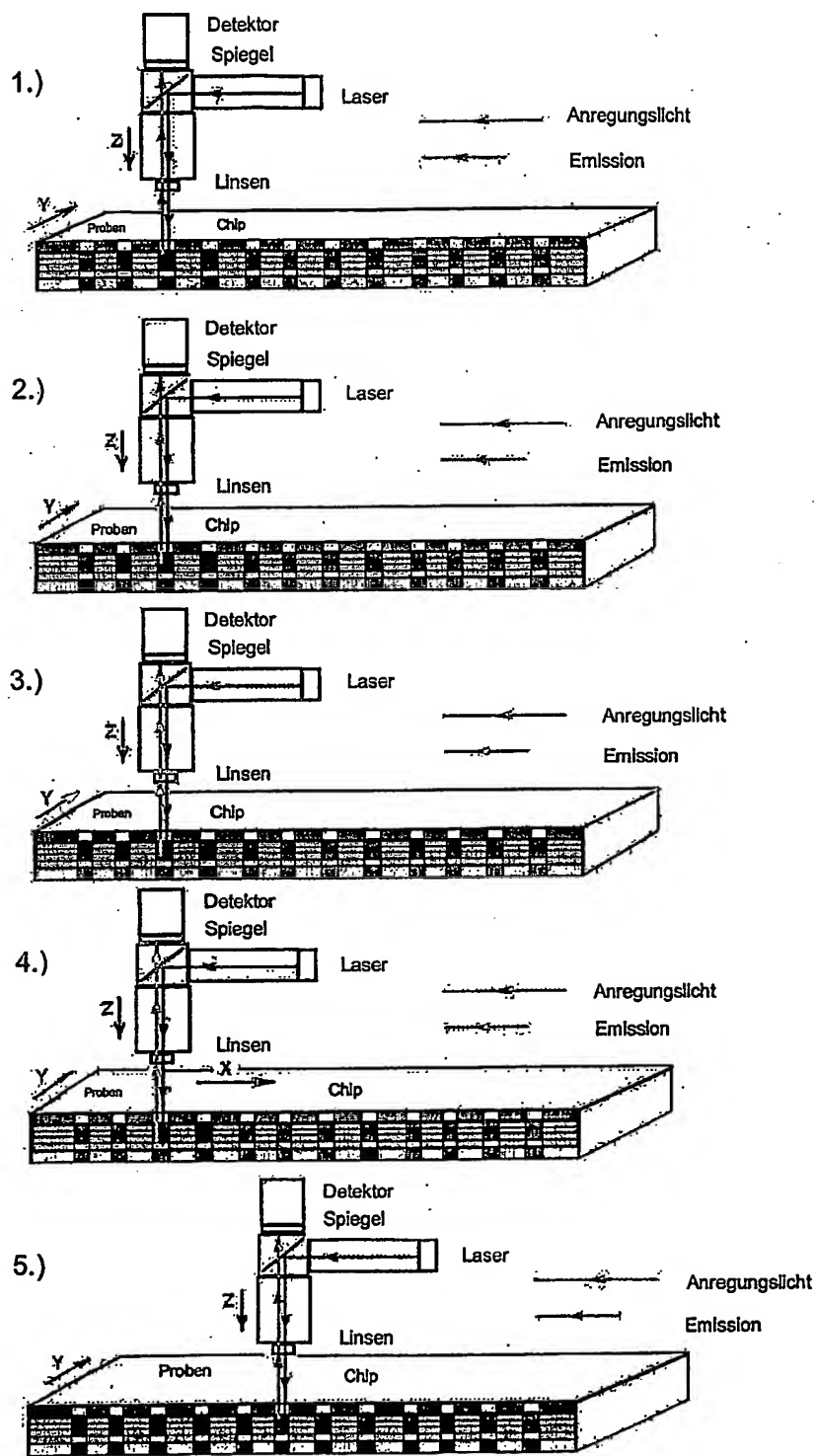


Fig. 3

4/7

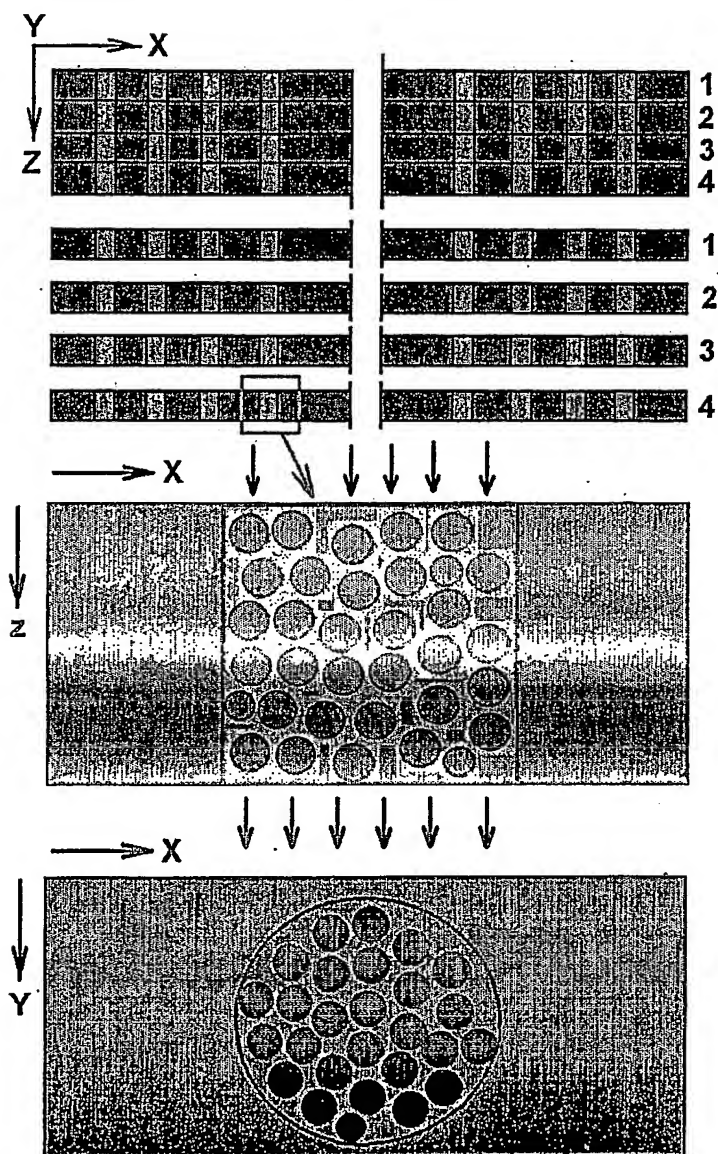


Fig. 4

5/7

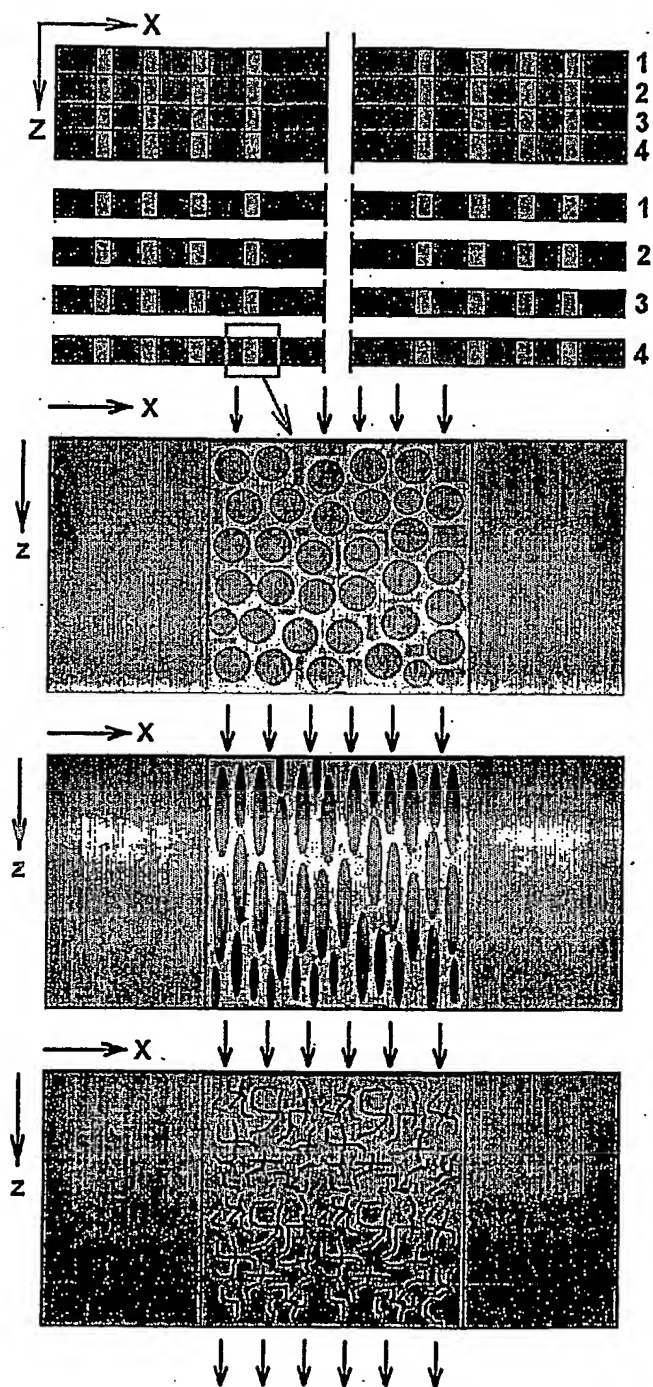


Fig. 5

6/7

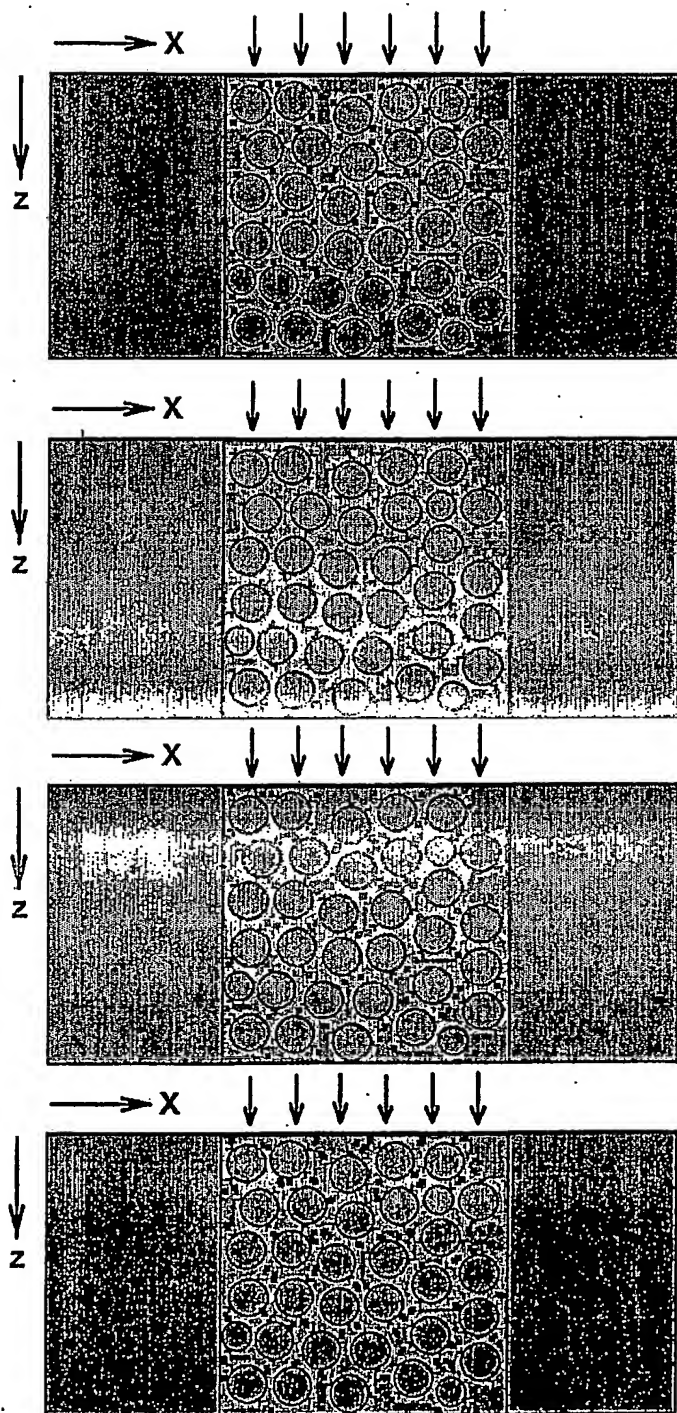


Fig. 6

7/7

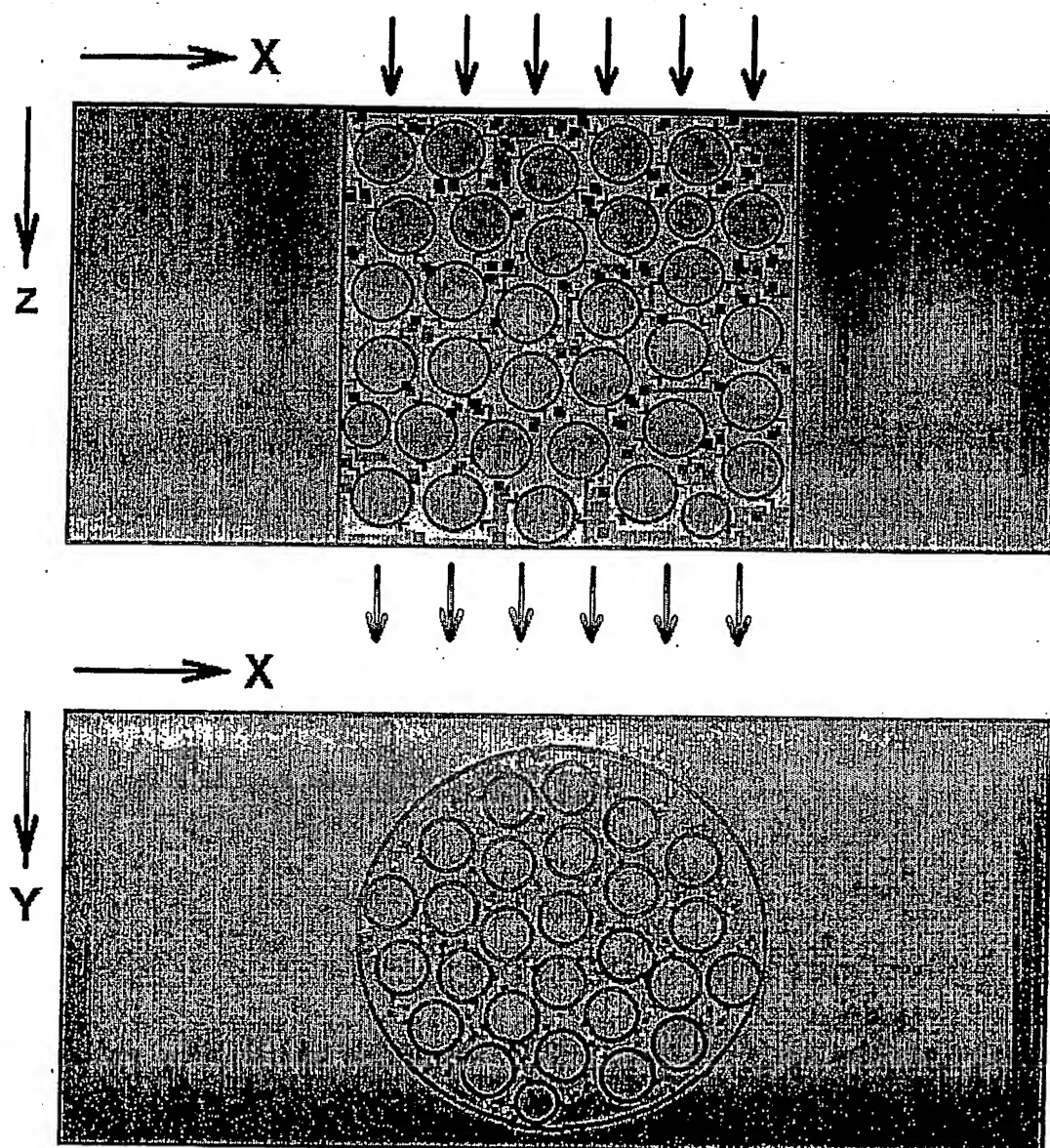


Fig. 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/003720

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 B01J19/00 B01L3/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01J B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/13313 A (HUDSON JAMES R JR ; GENOVATIONS INC (US); DAWSON ELLIOTT P (US)) 18 March 1999 (1999-03-18) page 4, line 31 - page 5, line 9 page 6, line 5 - page 7, line 25; claims 16-20; figures 4-7	1-6
X	WO 01/09607 A (LARGE SCALE PROTEOMICS CORP) 8 February 2001 (2001-02-08) page 49, line 8 - page 50, line 3; figure 8	1-6
X	US 2002/051995 A1 (KUMAR RAJAN) 2 May 2002 (2002-05-02) paragraph '0018! - paragraph '0024!; claims 1,11,20; example 4 paragraph '0047!	1-5,8
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10 August 2004</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">17/08/2004</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Veefkind, V</div>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/003720

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/094533 A1 (HESS ROBERT A ET AL) 18 July 2002 (2002-07-18) paragraph '0153! - paragraph '0162!; claim 12 example 1	1-5,7
A	WO 02/081077 A (MILLENNIUM PHARM INC) 17 October 2002 (2002-10-17) figures 1,2	1-5
X	WO 99/60170 A (HYSEQ INC) 25 November 1999 (1999-11-25) page 21, line 29 - line 31; figures 6,7 page 22, line 11 - page 23, line 26	8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/003720

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplemental sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2004/003720

Continuation of Box III

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1 to 6

Chip and method for producing it.

2. Claim 7

Method for producing a chip.

3. Claim 8

Use of confocal laser scanning microscopy to analyse a three-dimensional chip.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/003720

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913313	A	18-03-1999	AT 235682 T	15-04-2003
			AU 733589 B2	17-05-2001
			AU 7498598 A	29-03-1999
			CA 2301539 A1	18-03-1999
			CA 2407257 A1	18-03-1999
			CA 2407260 A1	18-03-1999
			CA 2407263 A1	18-03-1999
			CA 2407265 A1	18-03-1999
			CN 1269883 T	11-10-2000
			DE 69812655 D1	30-04-2003
			DE 69812655 T2	25-09-2003
			DK 1012564 T3	21-07-2003
			EP 1207383 A2	22-05-2002
			EP 1176413 A2	30-01-2002
			EP 1012564 A1	28-06-2000
			ES 2190591 T3	01-08-2003
			IL 134702 A	28-03-2004
			JP 2001515735 T	25-09-2001
			PT 1012564 T	29-08-2003
			WO 9913313 A1	18-03-1999
			US 2003096292 A1	22-05-2003
			US 2001019827 A1	06-09-2001
WO 0109607	A	08-02-2001	US 6713309 B1	30-03-2004
			AU 6750200 A	19-02-2001
			CA 2376489 A1	08-02-2001
			EP 1204867 A1	15-05-2002
			JP 2003527569 T	16-09-2003
			JP 2003014750 A	15-01-2003
			JP 2003014751 A	15-01-2003
			JP 2003014752 A	15-01-2003
			JP 2003028868 A	29-01-2003
			JP 2003028879 A	29-01-2003
			JP 2003004738 A	08-01-2003
			JP 2003028869 A	29-01-2003
			JP 2003014753 A	15-01-2003
			JP 2003014754 A	15-01-2003
			JP 2003014755 A	15-01-2003
			JP 2003014756 A	15-01-2003
			JP 2003014757 A	15-01-2003
			JP 2003014758 A	15-01-2003
			JP 2003014759 A	15-01-2003
			JP 2003028870 A	29-01-2003
			WO 0109607 A1	08-02-2001
			US 2003044855 A1	06-03-2003
			US 2001012537 A1	09-08-2001
			US 2002015952 A1	07-02-2002
			US 2001041339 A1	15-11-2001
US 2002051995	A1	02-05-2002	US 2002061538 A1	23-05-2002
			US 2002068299 A1	06-06-2002
US 2002094533	A1	18-07-2002	US 2003180807 A1	25-09-2003
			US 2003124716 A1	03-07-2003
			AU 9680901 A	22-04-2002
			CA 2425476 A1	18-04-2002
			EP 1330306 A2	30-07-2003
			JP 2004510996 T	08-04-2004

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/003720

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002094533 A1		WO 0230561 A2 US 2002001546 A1	18-04-2002 03-01-2002
WO 02081077 A	17-10-2002	CA 2443035 A1 EP 1385619 A2 WO 02081077 A2 US 2003092064 A1	17-10-2002 04-02-2004 17-10-2002 15-05-2003
WO 9960170 A	25-11-1999	AU 4194899 A WO 9960170 A1 US 2003036084 A1	06-12-1999 25-11-1999 20-02-2003

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003720

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 B01J19/00 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 B01J B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99/13313 A (HUDSON JAMES R JR ; GENOVATIONS INC (US); DAWSON ELLIOTT P (US)) 18. März 1999 (1999-03-18) Seite 4, Zeile 31 - Seite 5, Zeile 9 Seite 6, Zeile 5 - Seite 7, Zeile 25; Ansprüche 16-20; Abbildungen 4-7	1-6
X	WO 01/09607 A (LARGE SCALE PROTEOMICS CORP) 8. Februar 2001 (2001-02-08) Seite 49, Zeile 8 - Seite 50, Zeile 3; Abbildung 8	1-6
X	US 2002/051995 A1 (KUMAR RAJAN) 2. Mai 2002 (2002-05-02) Absatz '0018! - Absatz '0024!; Ansprüche 1,11,20; Beispiel 4 Absatz '0047!	1-5,8

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

10. August 2004

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

17/08/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Veeffkind, V

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/003720

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2002/094533 A1 (HESS ROBERT A ET AL) 18. Juli 2002 (2002-07-18) Absatz '0153! - Absatz '0162!; Anspruch 12 Beispiel 1 -----	1-5,7
A	WO 02/081077 A (MILLENNIUM PHARM INC) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Abbildungen 1,2 -----	1-5
X	WO 99/60170 A (HYSEQ INC) 25. November 1999 (1999-11-25) Seite 21, Zeile 29 - Zeile 31; Abbildungen 6,7 Seite 22, Zeile 11 - Seite 23, Zeile 26 -----	8

**Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

## 1. Ansprüche: 1-6

Chip und Verfahren seiner Herstellung  
---

## 2. Anspruch: 7

Verfahren zur Herstellung eines Chips  
---

## 3. Anspruch: 8

Verwendung konfokalen Laserscanmikroskopie zur Auswertung  
eines dreidimensionalen Chip  
---

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003720

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9913313 A	18-03-1999	AT 235682 T	15-04-2003
		AU 733589 B2	17-05-2001
		AU 7498598 A	29-03-1999
		CA 2301539 A1	18-03-1999
		CA 2407257 A1	18-03-1999
		CA 2407260 A1	18-03-1999
		CA 2407263 A1	18-03-1999
		CA 2407265 A1	18-03-1999
		CN 1269883 T	11-10-2000
		DE 69812655 D1	30-04-2003
		DE 69812655 T2	25-09-2003
		DK 1012564 T3	21-07-2003
		EP 1207383 A2	22-05-2002
		EP 1176413 A2	30-01-2002
		EP 1012564 A1	28-06-2000
		ES 2190591 T3	01-08-2003
		IL 134702 A	28-03-2004
		JP 2001515735 T	25-09-2001
		PT 1012564 T	29-08-2003
		WO 9913313 A1	18-03-1999
		US 2003096292 A1	22-05-2003
		US 2001019827 A1	06-09-2001
WO 0109607 A	08-02-2001	US 6713309 B1	30-03-2004
		AU 6750200 A	19-02-2001
		CA 2376489 A1	08-02-2001
		EP 1204867 A1	15-05-2002
		JP 2003527569 T	16-09-2003
		JP 2003014750 A	15-01-2003
		JP 2003014751 A	15-01-2003
		JP 2003014752 A	15-01-2003
		JP 2003028868 A	29-01-2003
		JP 2003028879 A	29-01-2003
		JP 2003004738 A	08-01-2003
		JP 2003028869 A	29-01-2003
		JP 2003014753 A	15-01-2003
		JP 2003014754 A	15-01-2003
		JP 2003014755 A	15-01-2003
		JP 2003014756 A	15-01-2003
		JP 2003014757 A	15-01-2003
		JP 2003014758 A	15-01-2003
		JP 2003014759 A	15-01-2003
		JP 2003028870 A	29-01-2003
		WO 0109607 A1	08-02-2001
		US 2003044855 A1	06-03-2003
		US 2001012537 A1	09-08-2001
		US 2002015952 A1	07-02-2002
		US 2001041339 A1	15-11-2001
US 2002051995 A1	02-05-2002	US 2002061538 A1	23-05-2002
		US 2002068299 A1	06-06-2002
US 2002094533 A1	18-07-2002	US 2003180807 A1	25-09-2003
		US 2003124716 A1	03-07-2003
		AU 9680901 A	22-04-2002
		CA 2425476 A1	18-04-2002
		EP 1330306 A2	30-07-2003
		JP 2004510996 T	08-04-2004



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003720

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002094533 A1		WO 0230561 A2	18-04-2002
		US 2002001546 A1	03-01-2002
WO 02081077 A	17-10-2002	CA 2443035 A1	17-10-2002
		EP 1385619 A2	04-02-2004
		WO 02081077 A2	17-10-2002
		US 2003092064 A1	15-05-2003
WO 9960170 A	25-11-1999	AU 4194899 A	06-12-1999
		WO 9960170 A1	25-11-1999
		US 2003036084 A1	20-02-2003

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**